2 型猪链球菌磷酸甘油酸激酶基因的克隆表达及酶活性测定

郭晓璐[1,2] 龚秀芳[2] 陈家锋[2] 丁晨曦[2] 胡丹[2] 潘秀珍[2] 王长军[1,2]**

（1 中国药科大学生命科学与技术学院 南京 211198 2 南京军区疾病预防控制中心 南京 210002）

摘要 目的：克隆表达 2 型猪链球菌中磷酸甘油酸激酶（PGK）并对其酶学特性进行测定。方法：采用 PCR 方法从 05ZYH33 基因组中扩增出 *pgk* 片段，构建重组表达质粒 pET28a:*pgk*，经双酶切及测序验证正确的质粒转化入 *E.coil* BL21(DE3)中进行 IPTG 诱导表达，重组 PGK 蛋白经 SDS-PAGE 和质谱鉴定并测定其酶学活性。结果：PGK 在大肠杆菌中可溶性表达，纯化后得到约 43 kDa 的重组 PGK 蛋白，其酶促反应最适温度为 25 ℃，最适 pH 为 7.5，2 型猪链球菌 PGK 的酶活性为 75 U/mL，PGK 相对于 3-PGA 的 Km 值为 1.744 mmol/L，Vmax 为 0.143 mmol/L/min，相对于 ATP 的 Km 值为 2.266 mmol/L，Vmax 为 0.318 mmol/L /min。结论：利用原核表达系统成功地表达了 2 型猪链球菌中的 PGK，并获得了活性较好的重组 PGK，酶学检测发现纯化的 PGK 具有良好的体外活性，为进一步研究该病在 2 型猪链球菌致病及代谢机制奠定了基础。

关键词 2 型猪链球菌；磷酸甘油酸激酶；克隆表达；酶活性

*国家自然科学基金(No.81481920，No.81501725)、军队后勤科研计划项目(AWS16J021，AWS16J023，BWS14J025，BWS14C051)

＊＊通讯作者，电子信箱: science2008@hotmail.com

Gene Cloning, Expression and Identification of Phosphoglyceric Kinase of *Streptococcus suis* serotype 2

Guo Xiao-lu[1,2] Gong Xiu-fang[2] Chen Jia-feng[2] Ding Chen-xi[2] Hu Dan[2] Pan Xiu-zhen[2] Wang Chang-jun[2]

(1 School of Life Science and Technology，China Pharmaceutical University,Nanjing 211198, China)

(2 Department of Epidemiology, Medicinal Research Institute, Nanjing Military Command, Nanjing, 210002, China.)

Abstract Objective: To prokaryotically clone and express phosphoglycerate kinase(PGK) from *Streptococcus suis* serotype 2 and determine enzymatic properties of recombination protein. Methods: *pgk* gene was amplified from the 05ZYH33 genome DNA by PCR and inserted into expression vector pET28a by double digestion. The combined prokaryotic expression plasmid pET28a:*pgk* was subsequently transformed into *E.coli* BL21 and induced by IPTG. The induction result was identified by SDS-PAGE and LC-MS/MS, the recombination PGK was then purified by Ni affinity chromatography and used for enzymatic activity measurement. Results: PGK protein had a high and soluble expression and displayed a molecular weight about 43 kDa in *E.coli* BL21. The enzymatic activity was then measured by using purified PGK. The enzymatic activity of recombination PGK protein was 75 U/ml. The optimum temperature and pH was 25 ℃ and 7.5, respectively. Kinetic analyses with respect to 3-PGA as substrate gave a Km of 1.744 mmol/L and ATP as substrate gave a Km of 2.266 mmol/L. Conclusion: The *pgk* gene has been successfully expressed by prokaryotic expression system and the purified recombinant PGK protein had a similar enzymatic activity other protein enzymes and showed the best enzymatic activity in optimum condition.

Key Words: *Streptococcus suis* serotype 2; phosphoglycerate kinase; prokaryotic expression; enzymatic activity

猪链球菌（*Streptococcus suis*，SS）是链球菌属的革兰阳性菌。由于荚膜抗原的不同可分为 33 个血清型，根据毒力的不同分为强毒株、弱毒株及无毒株，其中 2 型猪链球菌（*Streptococcus suis* serotype 2，SS2）在临床上检出率最高，且毒力最强，除人和猪外，还可造成羊、马、猫及狗等其他动物感染[1-2]，感染

后造成宿主出现脑膜炎、关节炎、败血病等。继 1998 年和 2005 年在中国爆发了两次大规模的感染疫情外，在世界范围内主要呈散发感染，2013 年报道[3]，在越南、泰国及中国先后有 1642 例患者感染猪链球菌，给公共卫生安全造成威胁，并给养猪业带来巨大经济损失，受到广泛关注。

猪链球菌致病涉及到细菌在宿主中的粘附、侵袭及扩散等多个方面。目前已经被报道的毒力相关分子超过 60 个[4]，但是其致病机制仍有待阐明。这些已经报道过的毒力相关分子主要有荚膜多糖（Capsular polusaccharide， CPS）、溶血素（Suilysin，SLY），胞外因子（Extra-cellular factor，EF）、谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase，GDH）等。一般地，细菌对宿主表面的粘附是形成感染的最初阶段，近年研究发现某些代谢过程中的蛋白酶不仅在细菌的生长和代谢中发挥重要作用，同时作为兼职蛋白在细菌表面出现，这类酶既无信号肽，也无 LPXTG 细胞壁锚定结构域，但能参与细菌毒力的调控[5]，如 6-磷酸葡糖酸脱氢酶[6]（6-phosphogluconate-dehydrogenase，6-PGD）除参与体内代谢外，在肺炎链球菌与猪链球菌的表面发现并且与毒力相关；烯醇化酶（α-enolase）位于 SS2 细菌表面时，可与宿主纤连蛋白结合，诱发宿主发生炎症[8]。磷酸甘油酸激酶（PGK）是细菌糖酵解中的重要酶，能催化 3-磷酸甘油酸（3-PGA）和三磷酸腺苷（ATP）发生酶促反应产生一分子二磷酸腺苷（ADP）和 1,3-二磷酸甘油酸（1,3-DPG），为细菌代谢提供能量，现已发现肺炎链球菌及无乳链球菌表面存在 PGK，并能与宿主纤维蛋白溶酶原结合[9-10]，在细菌粘附中发挥重要作用。但在 SS2 中未见该酶相关的报道。

本课题组前期研究中发现 SS2 05ZYH33 基因组中存在与肺炎链球菌及无乳链球菌 *pgk* 的同源类似物，为研究该蛋白在 2 型猪链球菌中的致病机制，首先

我们构建了合适的克隆表达系统对 PGK 进行表达、纯化，并测定其体外酶活性，为研究其在致病过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SS2 菌株 05ZYH33、表达质粒 pET28a 由本实验室保存，大肠杆菌 *E.coil* DH5α及 BL21(DE3)购自全式金生物技术公司。限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I 及 DNA Marker 购自 Takara 有限公司。KOD-Plus 高保真 PCR 酶及 ligation high 连接酶购自东洋纺生物科技有限公司。DNA 割胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒及 Bradford 法蛋白质定量检测试剂盒购自上海生工生物技术公司。蛋白质 Marker 购自 Thermo 科技有限公司，PGK 酶活测定中 NADH、3-PGA、ATP、GAPDH 均购自 Sigma-Aldrich 公司。三乙醇胺购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 引物设计

根据 SS2 05ZYH33 全基因组中 *SSU05_0157* 编码的 *pgk* 的基因序列，利用 DNAStar 设计 *pgk* 扩增引物，序列如下（5 序列如下），

Forword :CGGGATCCATGGCAAAATTGACTGTTAAAG，（下划线为酶切位点 *Bam*HI）；

Reverse：CCGCTCGAGTCATTTTTCAGTCAAAGCTGC，下划线部分酶切位点 *Xho*I)，

引物送由上海生工生物技术公司合成。

1.3 *pgk* 基因的扩增

以 05ZYH33 的基因组为模板，利用 PCR 的方法，以 KOD-Plus 酶扩增 *pgk* 基因，扩增条件为 94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 15 s，58 ℃退火 30 s，68 ℃延

伸 90 s，30 个循环，68 ℃再延伸 10 min。PCR 产物经 1 %琼脂糖凝胶电泳检测，电泳条件为 120 V，电泳 30 min。

1.4 pET28a:*pgk* 表达质粒的构建

PCR 扩增得到的基因片段及 pET28a 质粒用 *Bam*HI 及 *Xho*I 内切酶双酶切，经 1 %琼脂糖凝胶分离，利用胶回收试剂盒对 *pgk* 基因片段与线性化 pET28a 片段进行割胶回收后，ligation high 连接酶 16 ℃连接 1 h。连接产物转化至 *E.coli* DH5α，37 ℃过夜培养，挑选阳性克隆，提质粒经 PCR 验证和双酶切验证后，送至上海生工生物技术公司测序鉴定。

1.5 重组质粒 pET28a:*pgk* 诱导表达及纯化

1.5.1 重组蛋白 PGK 诱导表达

将测序正确的 pET28a:*pgk* 热转化入 *E.coli* BL21(DE3)中过夜培养后，次晨挑取单菌落转接入含卡那霉素（100 μg/ml）LB 培养基中培养至 OD_{600} 约为 0.6，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，37 ℃诱导 4 h。离心收集菌体并经 PBS 洗涤后超声破碎，离心后分别取上清及沉淀进行 SDS-PAGE 分离，观察分析是否有目的蛋白表达以及目的蛋白的表达形式。

1.5.2 重组蛋白 PGK 纯化

收集表达菌液破碎上清，经 0.22 μm 滤膜过滤后, 用 PBS 平衡的 Ni 离子亲和层析柱纯化 PGK 蛋白，洗脱液经 SDS-PAGE 鉴定蛋白的分子质量及纯度。

1.6 重组蛋白 PGK 质谱鉴定

纯化后的 PGK 经 SDS-PAGE 电泳分离后，切下目的条带送至华大基因进行蛋白质谱测序。目的蛋白经蛋白酶切后利用 Q-TOF 进行质谱分析，质谱数据利用 Data analysis 软件进行检索，得到 PGK 蛋白的 LC-MS/MS 报告单，确定是否为 PGK。

1.7 PGK 酶学性质测定

PGK 能催化 3-PGA 和 ATP 发生酶促反应产生一分子 ADP 和 1,3-DPG，由于该反应无特征紫外吸光度变化，故选择酶偶联法与紫外分光光度法联合检测。ADP 和 1,3-DPG 在 3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）的作用下，产生 3-磷酸甘油醛和氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+），NADH 在 340 nm 波长处有特征峰，故可用反应前后 340 nm 处吸光度减少量间接反映 PGK 酶的活性。将重组 PGK 酶活性定义为：25 ℃下，测定体系 pH 7.5，每分钟消耗 1 μmol 3-PGA 生成 1,3-DPG 的酶量为一个酶单位 U。

1.7.1 NADH 光密度标准曲线绘制

配制不同浓度的 NADH 溶液（0.04 mmol/L、0.08 mmol/L、0.12 mmol/L、0.016 mmol/L、0.2 mmol/L），在 340 nm 处测定吸光度，试验重复三次，以 NADH 浓度为横坐标，340nm 处吸光度为纵坐标绘制 NADH 光密度标准曲线。

1.7.2 酶活性测定

参照 Reddy G K [11]和 Hong Y [12]的方法，PGK 酶活测定反应体系为 100 mmol/L 三乙醇胺缓冲液（pH 7.5），5 mmol/L $MgSO_4$，1 mmol/L EDTA，1 mmol/L DTT，0.2 mmol/L NADH，1 mmol/L ATP，5 mmol/L 3-PGA，4 U/ml GAPDH，酶活测定总体积为 1 ml，加入酶活测定溶液，在 25 ℃下孵育 5 min 后，分别加入 1 μl 重组 PGK 和 BSA，采用连续检测法分别记录二者 340 nm 处的吸光度值的变化，以酶促反应时间为横坐标，340 nm 处吸光度为纵坐标绘制反应曲线，并用下述公式计算重组 PGK 及 BSA 的酶活性。

酶活性（U/ml）= $[(\Delta A + 0.0653)/4.8999] \times 1000/t$ （1）

其中ΔA 为 340 nm 处的吸光度值变化量；1000 为将 1 μl 稀释酶液中的酶活性折算为 1 ml 的酶活性；t 为反应时间；4.8999 与 0.0653 为标准曲线系数。

另外，采用 Bradford 法蛋白质定量检测试剂盒测定重组 PGK 蛋白质含量，计算重组 PGK 的比活力。比活力定义为: 每毫升酶蛋白所具有的酶活力单位数，单位 U /mg。

1.7.3 酶活性反应的最适温度

为确定 PGK 酶促反应最适反应温度，在 pH 7.5，反应时间 90 s，分别测定在 15 ℃、25 ℃、35 ℃、45 ℃、55 ℃、65 ℃下反应前后 340 nm 处吸光度变化，试验重复三次，最高酶活定为 100 %，测定不同温度对 PGK 酶活的影响。

1.7.4 酶活性反应的最适 pH 值

配制 pH 分别为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、11.5 的酶活检测缓冲液，在 25 ℃下反应 90 s，测定 340 nm 处吸光度值的变化，试验重复三次，最高酶活定为 100 %，考察不同 pH 对 PGK 酶活的影响。

1.7.5 PGK 酶学动力学参数测定

将反应底物 3-PGA 的浓度[S]分别调至 0 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L、5 mmol/L、6 mmol/L、7 mmol/L，在 pH 7.5，25 ℃反应 90 s，测定 340 nm 处吸光度的变化量，并计算出 NADH 每分钟的减少量[V]，根据米氏方程改写式对 V 和 S 分别做倒数，以 1/[S]为横坐标，1/*v* 为纵坐标做直线回归方程，得出 PGK 酶促反应相对于 3-PGA 的 Km 及 Vmax。另将反应底物 ATP 浓度分别调至 0 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1 mmol/L，1.2 mmol/L 按照上述方法计算 PGK 酶促反应相对于 ATP 的 Km 及 Vmax。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pET28a:*pgk* 的构建及鉴定

利用 Forward 和 Reverse 从 SS2 05ZYH33 全基因组中扩增出的 *pgk* 扩增产物经 1 %琼脂糖凝胶电泳分析，约 1200 bp（图 1a），与预期一致。将扩增出的 PCR 产物连接至表达载体 pET28a，以热转化的方法将重组质粒转化大肠杆菌 DH5α 的感受态细胞中，将菌液涂布于卡那霉素的 LB 平板筛选。重组质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定（图 1b），结果与预期一致，经测序鉴定的基因序列与原始序列相似性为 100%，重组质粒命名为 pET28a:*pgk*。

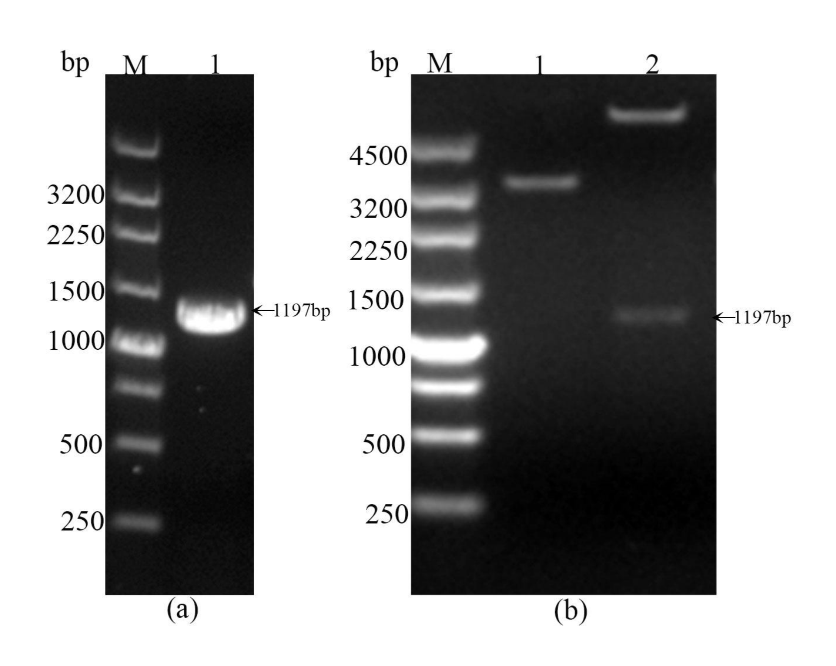


图 1 *pgk* 基因克隆及表达质粒构建

Fig.1 Amplification of *pgk* gene and double digestion of recombinant pET28a:*pgk* plasmid

(a) Cloning of *pgk* gene fragment M: 250 bp DNA Marker; 1: *pgk* gene fragment（1197 bp）; (b) Double digestion of plasmid pET28a:*pgk*. M: 250 bp DNA Marker; 1: Undigested plasmid pET28a:*pgk*; 2: Plasmid pET28a:*pgk* digested by *Bam*HI and *Xho*I.

2.2 PGK 重组蛋白的诱导表达及纯化

将测序正确的 pET28a:*pgk* 热转化 *E.coil* BL21(DE3)感受态细胞，获得重组菌，并进行诱导表达，结果发现诱导后的重组质粒 pET28a:*pgk* 在 43 kDa 出现了明显的诱导条带，分子量大小与用生物信息学软件预测的 PGK 蛋白大小预测值一致。将诱导后的重组菌超声，离心分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，

发现重组蛋白 PGK 在上清和沉淀中都有表达，且大部分存在于上清中，提示该蛋白呈可溶性表达，利用 Ni 离子亲和层析柱纯化后的蛋白在 43kDa 显示单一条带，与预期分子量一致（图 2）。

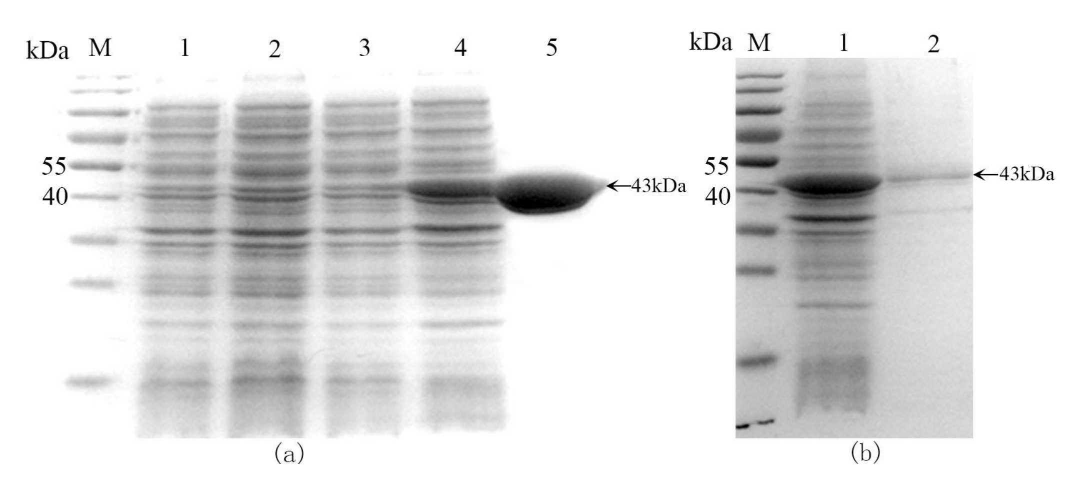


图 2 SDS-PAGE 鉴定 PGK 蛋白表达

Fig.2 Expression analysis of instreested protein by SDS-PAGE

(a) M: Protein Marker ;1: Un-induced *E. coil* BL21/pET28a; 2. .*E. coil* BL21/pET28a induced with IPTG; 3 Un-induced *Ecoil*BL21/pET28a:*pgk*; 4: *E. coil* BL21/pET28a:*pgk* induced with IPTG; 5: Purified PGK protein (b) M: Protein Marker ; 1:Soluble cell lysates induced with IPTG; 2: Inclusion body induced with IPTG

2.3 重组蛋白 PGK 质谱鉴定结果

纯化后的 PGK 经 SDS-PAGE 电泳分离后，对凝胶进行考马斯亮蓝染色，切下目的条带送至华大基因进行 Q-TOF 质谱验证。质谱鉴定结果显示，重组 PGK 与预测的 SS2 PGK 氨基酸序列相似度为 89.22 %，其中划线部位为完全一致肽段，即为我们的目的蛋白。

1 MAK**LTVKDVE LK**GKKVLVR**V DFNVPLKDGV ITNDNR**ITAA LPTIK**YILEQ**

51 **GGRAILFSHL GR**VKEEADKE GK**SLAPVAAD LAAKLGQDVA FIAGATRGAE**

101 **LEAAINALED GQVLLVENTR FEDVDGK**KES K**NDEELGKYW ASLGDGIFVN**

151 **DAFGTAHRSH ASNVGISANV EKAVAGFLLE NEIAYIQEAV ETPERPFVAI**

201 **LGGSKVSDKI GVIENLLEKA DKVLIGGGMT YTFYKAQGIE IGNSLVEEDK**

251 **LDVAK**TLLEK ANGK**LILPVD SKEANAFAGY TEVRDTDGEA VSEGFLGLDI**

301 **GPKSIAKFDE ALTGAKTVVW NGPMGVFENP DFQAGTIGVM DAIVKQPGVK**

351 SIIGGGDSAA AAINLGRADK FSWISTGGGA SMELLEGKVL PGLAALTEK

2.4 重组 PGK 酶活性测定

2.4.1 NADH 标准曲线绘制

NADH 在 340nm 处有特征吸收峰，随着酶促反应的进行，NADH 消耗，产生 NAD^+，而后者在 340nm 处无特征吸收峰，故可用 NADH 反应前后 340 nm 处吸光度减少量间接反映 PGK 酶的活性。在 340 nm 处测定不同浓度 NADH（0.04-0.2mmol/L）的吸光度，试验重复三次。以 NADH 浓度为横坐标，340 nm 处吸光度为纵坐标绘制 NADH 光密度曲线 y = 4.8999x-0.0653（R^2 = 0.9995），具有较高的可靠性（图 3）。

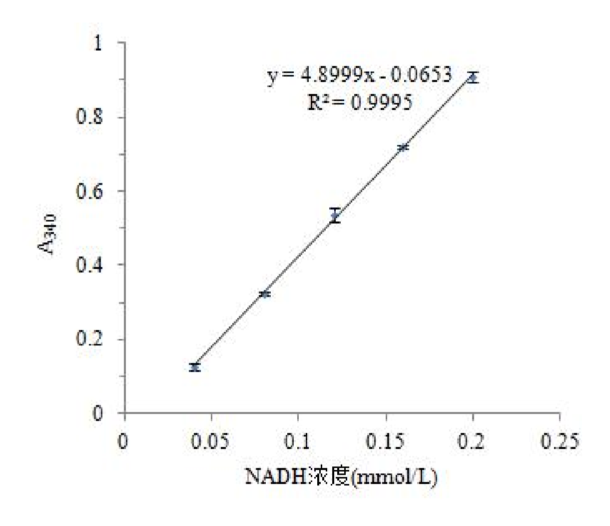


图 3 NADH 光密度标准曲线

Fig.3 The standard curve of NADH

2.4.2 PGK 蛋白酶活性测定

按照 1.7.2 配制酶活反应体系，采用连续检测法，以时间为横坐标，340 nm 处吸光度为纵坐标绘制时间-吸光度曲线如图 4，经过 90 s 反应，反应基本达到平衡，试验重复三次。由于 PGK 酶促反应速度较快，故将酶促反应平衡的时间作为最适反应时间。根据 NADH 光密度标准曲线及重组 PGK 酶活性计算公式（1）式，计算重组 PGK 的酶活力为 75 U/ml，Bradford 法测得重组 PGK 浓度

为 0.4mg/ml，故重组 PGK 的比活力为 187.5U/mg。BSA 作为阴性对照无活性，结果说明本次制备的重组 PGK 蛋白具有较好的酶活力。

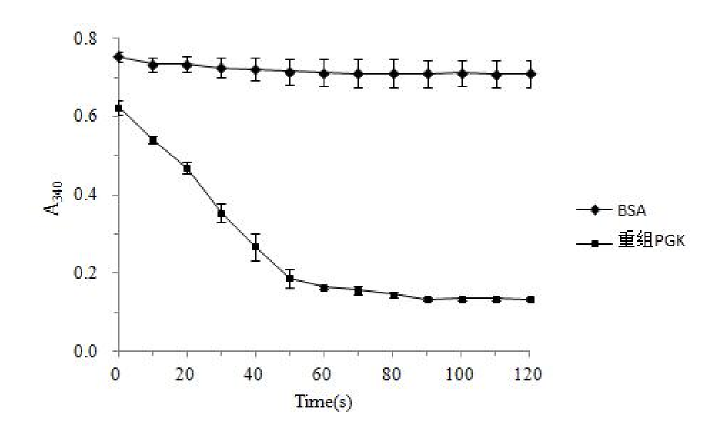


图 4 重组 PGK 时间-吸光度曲线

Fig.4 Time- absorbance curve of PGK

2.4.3 pH 对 PGK 蛋白酶活性影响

同种酶在不同的 pH 下呈现不同的反应活性，只有在特定缓冲液及特定 pH 中才能表现出最大的反应活性，即最适反应活性。本次研究探究了在 25 ℃，反应 90 s，不同 pH（4.5-11.5）酶活测定体系中 340 nm 处吸光度值变化，试验重复三次。以最高酶活为 100%，绘制 pH 对重组 PGK 酶活的影响曲线（图 5），结果显示该酶在 pH 值为 6.5-8.5 时，酶维持较高的活性，在 pH 为 7.5 时达到最高，pH 低于 6.5 或高于 8.5 酶活性均显著下降。

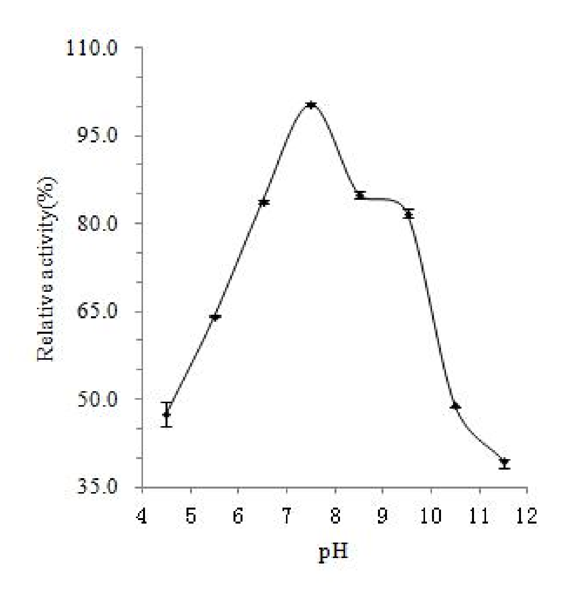


图 5 pH 对重组 PGK 酶活的影响

Fig.5 The effect of pH on PGK activity

2.4.4 温度对 PGK 蛋白酶活性影响

一定条件下，一种酶只在特定温度下表现最大酶活性，即该酶的最适反应温度。本次研究分别测定了 pH7.5，反应 90 s， 15 ℃ - 65 ℃中 6 个不同反应温度下 PGK 的酶活性，试验重复三次。以最高酶活为 100%，绘制温度对重组 PGK 酶活的影响曲线（图 6），结果显示，随着反应温度的升高，重组 PGK 活性逐渐增长，25 ℃时达到峰值，此后随着温度的增加酶活性逐渐降低，反应温度达到 55 ℃后，酶活性急剧下降。

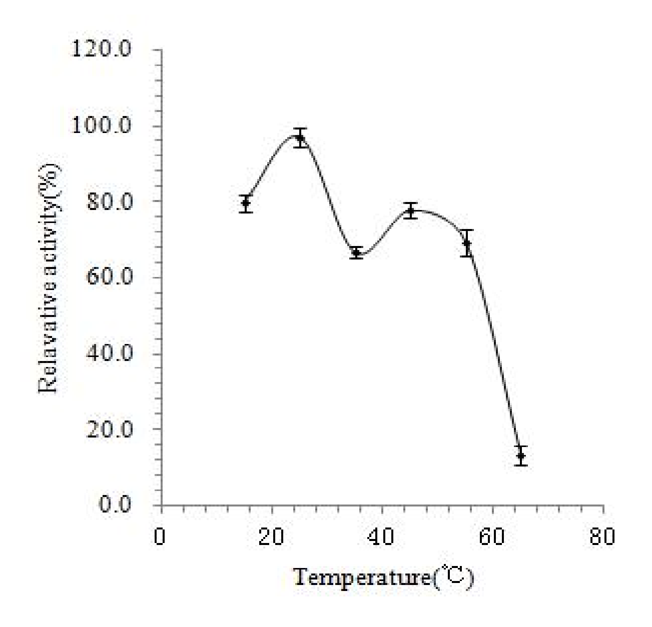


图 6 反应温度对 PGK 酶活性的影响

Fig.6 The effect of temperature on PGK activity

2.4.5 PGK 酶学动力学参数测定

（1）重组 PGK 相对于 3-PGA 的 Km 值

米氏常数 Km 是酶促反应的特征常数，Km 越小，则酶与底物结合能力越强[13]。在 25 ℃，pH 7.5 下，固定 ATP 浓度，以不同浓度 3-PGA（0-7mmol/L）为底物，分别测定 PGK 的催化反应速率，以 3-PGA 浓度的倒数为横坐标，反应速率的倒数为纵坐标绘制直线回归方程（图 7），利用米氏方程改写式：

$$\frac{1}{v}=\frac{Km}{V\max}\times\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V\max} \quad (2)$$

得出重组 PGK 相对于 3-PGA 的 Km 值为 1.744 mmol/L， Vmax 为 0.143 mmol/L/min。

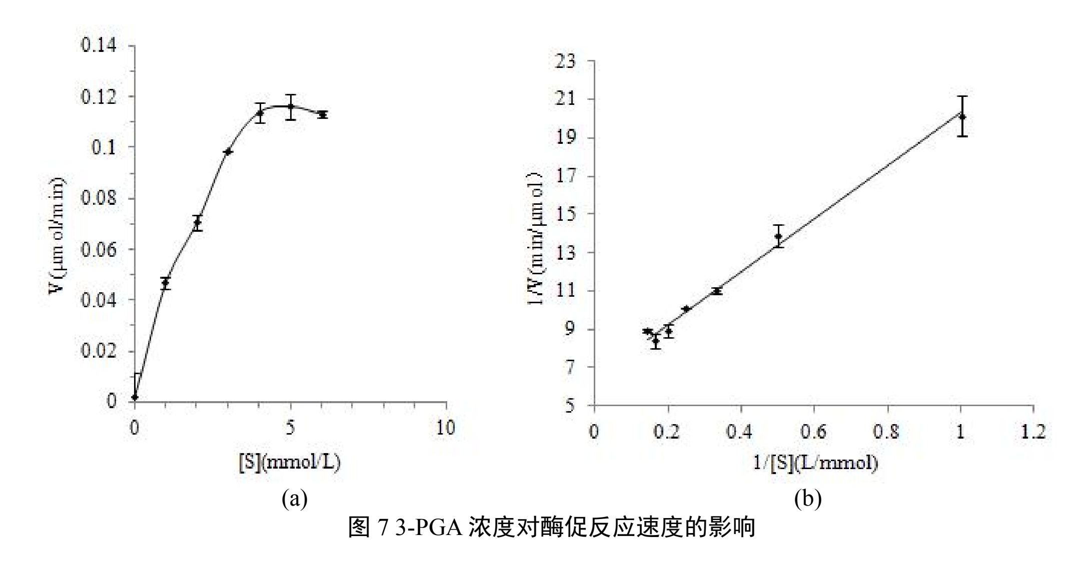


图 7 3-PGA 浓度对酶促反应速度的影响

Fig.7 The effect of concentration of the 3-PGA on activity of PGK.

(a) Variation of the velocity in function of the substrate concentration (b) Double reciprocal plot of PGK activity as a function of the3-PGA concentration

（2） 重组 PGK 相对于 ATP 的 Km 值

在 25 ℃，pH 7.5 下，固定 3-PGA 浓度，以不同浓度 ATP（0-1.2mmol/L）为底物，分别测定 PGK 的催化反应速度，以 ATP 浓度的倒数为横坐标，反应速率的倒数为纵坐标绘制直线回归方程（图 8），利用（2）式求得重组 PGK 相对于 ATP 的 Km 值为 2.266 mmol/L，Vmax 为 0.318 mmol/L/min。

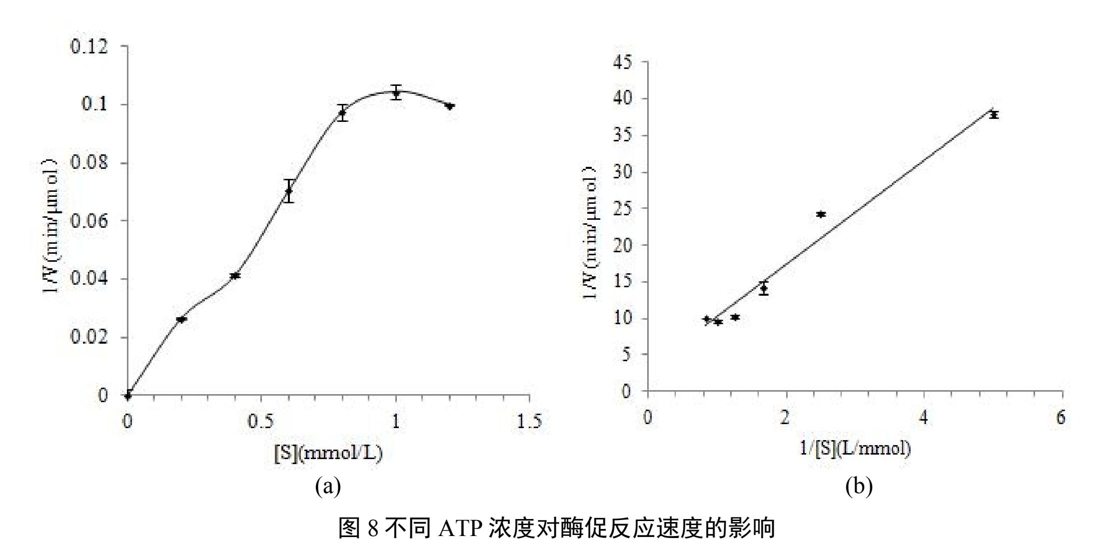


图 8 不同 ATP 浓度对酶促反应速度的影响

Fig.8 The effect of concentration of the ATP on activity of PGK

(a) Variation of the velocity in function of the ATP concentration (b) Double reciprocal plot of PGK activity as a function of the ATP concentration

3 讨论

糖酵解是细菌获得自身生长、代谢所需能量的主要途径之一，目前已知PGK是糖酵解过程中重要酶，能催化3-PGA和ATP发生酶促反应，为细菌代谢提供能量, 同时PGK也是一种兼职蛋白，也参与细菌其他重要的生命活动。PGK在无乳链球菌及日本血吸虫等寄生虫中的代谢已有较多研究，Tyler J等发现无乳链球菌中PGK存在于细菌分泌上清及细菌表面，能绑定宿主血纤维蛋白溶酶原及肌动蛋白，而且PGK对人Hela细胞的肌动蛋白骨架具有破坏作用[15]。黄莉妮等[16]对日本血吸虫中PGK酶学活性进行了研究，并证明该酶在虫体表膜存在，并具有较好的免疫原性。但我们对2型猪链球菌中的PGK知之甚少。本课题组在对SS2 05ZYH33全基因组注释中发现编码*pgk*类似物基因*SSU05_0157*，序列相似性分析发现其氨基酸序列与无乳链球菌和肺炎链球菌的同源性高达97 %，推测其可能编码PGK，且在链球菌中高度保守。因此本研究对*SSU05_0157*基因编码的蛋白进行了重组表达并分析了该蛋白的体外酶学特性，为探究其在生物学功能及致病过程中作用奠定基础。

本研究成功克隆表达了2型猪链球菌05ZYH33中*pgk*基因，序列全长1197 bp，编码399个氨基酸。经原核表达、破碎后获得可溶性蛋白，上清蛋白经His标签纯化后获得大小约为43 kDa，纯度较高的重组蛋白，纯化后蛋白经质谱鉴定与预测的猪链球菌PGK蛋白序列相似度为89.22 %，为进一步酶学特性检测奠定了基础。

酶活性检测方法主要有化学反应法、荧光法、分光光度法及偶联法等，其中分光光度法及偶联法是酶活检测的常用手段[17]。本实验利用分光光度法与GAPDH偶联，通过NADH在340 nm处吸光度的变化量间接反应PGK的酶活性。酶活检测表明SS2 PGK具有与已知来源的酶相同的催化功能，但又具有特

定的酶学特性，在测定过程中由于 PGK 酶促反应较快，故选择连续检测 340 nm 处吸光度变。反应 90 s 时，反应达到平衡故将 90 s 作为最适反应时间。

我们的研究发现 SS2 PGK 在 15—45℃时达到最高酶活性的 60%以上，25 ℃时酶活性最高，由于 SS2 PGK 酶活测定体系复杂，故测得最适温度为反应体系中多种酶共同作用的结果。当测定体系温度高于 55 ℃时，PGK 酶活性急剧下降，我们推测由于温度过高，GAPDH 变性出现沉淀，从而间接影响了 PGK 的活性。

SS2 PGK 最适 pH 为 7.5，而无乳链球菌的最适 pH 为 6.7[18]，谷棒杆菌的最适 pH 在 7.0-7.4 之间[19]。不同细菌对温度与 pH 敏感性上的差异，可能来源于微生物适应各自宿主环境的表现，也可能是自然选择的结果[20]。

在酶学分析中，Km 是酶的基本特征常数，与反应温度、pH 及时间无关，本次研究确定了 SS2 PGK 相对于 3-PGA 的 Km 值为 1.744 mmol/L，Vmax 为 0.143 mmol/L/min，相对于 ATP 的 Km 值为 2.266 mmol/L，Vmax 为 0.318 mmol/L/min。

综上所述，本次研究获得了纯度较高的 SS2 PGK 蛋白，系统分析了其酶学特性，确定其最适反应温度及 pH，并利用反应动力学测定了底物对 PGK 的 Km 及 Vmax，为进一步研究该酶在 2 型猪链球菌中的代谢及致病机制提供了实验依据，并为其他链球菌中 PGK 的研究提供参考。

参考文献

[1] Okura M, Osaki M, Nomoto R, et al. Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. Pathogens, 2016, 5(3):45.

[2] Rosales, R.; Gómez, L.; de Mendoza, J.H. Fatal case of *Streptococcus suis* infection in a young wild boar(Sus. scrofa) from southwestern Spain. Zoo Wildl. Med. 2015, 46, 370–373.

[3] Tenenbaum T, Seitz M, Schroten H, et al. Biological activities of suilysin: role in *Streptococcus suis* pathogenesis. Future Microbiology, 2016, 11(7):941-954.

[4] Feng Y, Zhang H, Wu Z, et al. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases?. Virulence, 2014, 5(4):477.

[5] Pancholi V, Chhatwal G S. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. International Journal of Medical Microbiology Ijmm, 2003, 293(6):391.

[6] Chen T, Liu M, Liu J, et al. Vaccination with *Streptococcus suis* serotype 2 recombinant 6PGD protein provides protection against S. suis infection in swine. Fems Microbiology Letters, 2009, 296(1):78–83.

[8] Feng Y, Pan X, Sun W, et al. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. Journal of Infectious Diseases, 2009, 200(10):1583.

[9] Blom A M, Bergmann S, Fulde M, et al. *Streptococcus pneumoniae* Phosphoglycerate Kinase Is a Novel Complement Inhibitor Affecting the Membrane Attack Complex Formation. Journal of Biological Chemistry, 2011, 289(47):32499-32511.

[10] Boone T J, Tyrrell G J. Identification of the actin and plasminogen binding regions of *Group B Streptococcal* phosphoglycerate kinase. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(34):29035-29044.

[11] Reddy G K, Wendisch V F. Characterization of 3-phosphoglycerate kinase from Corynebacterium glutamicum, and its impact on amino acid production[J]. Bmc Microbiology, 2014, 14(1):54.

[12] Hong Y, Huang L, Yang J, et al. Cloning, expression and enzymatic characterization of 3-phosphoglycerate kinase from Schistosoma japonicum.[J]. Experimental Parasitology, 2015, 159:37.

[13] 谢喜珍, 林娟, 谢勇,等. 海洋来源琼胶酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(1):46-52..

Xie Xi-zhen，Lin Juan，Xie Yong, et al. Separation and Purification of Agarase and Study on Its Properties.China Biotechnology, 2017, 37(1): 46-52.

[15] Boone T J, Burnham C A, Tyrrell G J. Binding of *Group B Streptococcal* phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. Microb Pathog, 2011, 51(4):255-261.

[16] Yang H, Huang L, Yang J, et al. Cloning, expression and enzymatic characterization of 3-phosphoglycerate kinase from *Schistosoma japonicum*. Experimental Parasitology, 2015, 159:37-45.

[17] Lorenz R. Enzyme diagnosis in diseases of the heart, liver, and pancreas, S. Karger, New York, 1981: 9-62.

[18] Siddiqua.K. Mutant *Group B Streptococcus* surface expressed Phosphoglycerate kinase (PGK) with reduced plasminogen binding. University of Alberta;2014.

[19] Reddy G K, Wendisch V F. Characterization of 3-phosphoglycerate kinase from *Corynebacterium glutamicum* and its impact on amino acid production. Bmc Microbiology, 2014, 14(1):54.

[20]张凤玉, 胡丹, 龚秀芳,等. 2 型猪链球菌β-半乳糖苷酶基因的克隆表达及酶活性测定. 中国生物工程杂志, 2014, 34(2):39-44.

Zhang Feng-yu, Hu Dan, Gong Xiu-fang, et al.Cloning,expression and identification of gene encoding the β-Galactosidase of *Streptococcus suis* serotype 2.China Biotechnology, 2014, 34(2): 39-44.